

2014 年度 修士論文要旨

NPR と CSR の相互作用が低酸素応答を制御する機構の解明

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 今岡研究室 小山 千佳

哺乳動物細胞において NADPH-cytochrome P450 reductase (NPR) をノックダウンすると、血管内皮増殖因子(VEGF)や赤血球産生調節ホルモン(EPO)といった低酸素応答遺伝子の発現が抑制されることが報告されており、NPR が低酸素応答を制御していることが示唆されている。NPR はチトクローム P450 の電子供与体として働く酵素であるが、低酸素応答における役割は明らかとなっていない。そこで当研究室の先行研究において、yeast two hybrid 法を用いて NPR の相互作用因子を探索したところ、Cellular Stress Response (CSR) が同定された。CSR には CSR1, CSR2 という 2 種類の相同タンパク質が存在し、細胞が UV 照射や酸化ストレスを受けることで発現が誘導され、CSR を過剰に発現させた細胞では生じた活性酸素種が著しく減少し、細胞障害を防ぐことが報告されている。このことから CSR が酸化ストレス応答系に働いている可能性が示唆されたが、低酸素応答系における CSR の機能については未だ解明されていない。また CSR には多数の糖鎖修飾を受けると考えられるアミノ酸配列が存在することも知られている。卒業研究において、哺乳動物細胞における NPR と CSR の相互作用を明らかにし、さらに CSR を過剰発現させた HeLa 細胞では低酸素応答系が促進されることが示唆された。そこで本研究では、NPR と CSR の相互作用部位を特定し、これら 2 つの因子の相互作用が低酸素応答を制御する新たな機構を解明することを目的とした。まず哺乳動物細胞内での CSR と NPR の相互作用を明らかにするため、免疫沈降法を行った。結果として NPR と CSR1, 2 それぞれが共沈しているのが確認され、哺乳動物細胞内で CSR と NPR が相互作用していることが示唆された。さらに蛍光タグを付加した CSR, NPR の発現コンストラクトを用いて細胞内局在を観察したところ、NPR と CSR1, CSR2 はそれぞれ共局在していることが明らかとなった。この現象は低酸素条件下においても同様であった。また CSR の低酸素応答系での機能を解明するために CSR 過剰発現細胞、CSR ノックダウン細胞を構築し、低酸素応答系への影響を検討した。すると、CSR を過剰発現させることで低酸素応答遺伝子である VEGF や EPO mRNA 量が増加し、ノックダウンすると EPO で変化は見られなかったものの VEGF mRNA 量の減少が明らかとなり、CSR が低酸素応答系を促進する機能を持つことが示唆された。これらの結果より CSR は NPR と低酸素条件下において相互作用することで、低酸素応答系を制御している可能性が示され、新たな低酸素応答系の制御機構の存在が示唆された。